Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Versuche zur Gewinnung von reinen Insulinantikörpern

A. Reinigung von Insulinantikörpern durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat

B. Isolierung des Insulin-Insulinantikörper-Komplexes mit Hilfe von Aethacridinlactat und Natriumbromid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Disser
aus Stuttgart

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0092

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Versuche zur Gewinnung von reinen Insulinantikörpern

A. Reinigung von Insulinantikörpern durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat

B. Isolierung des Insulin-Insulinantikörper-Komplexes mit Hilfe von Aethacridinlactat und Natriumbromid

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Disser
aus Stuttgart

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kallee
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

I N H A L T

A. Reinigung von Insulinantikörpern durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat 1

I. Methoden 2

a. Seren und Ansätze 2

b. Absteigende fraktionierte Ammoniumsulfatfällung 4

II. Ergebnisse 6

a. Radioaktivitätsmessung 6

b. Schaubilder zur Radioaktivitätsmessung 10

c. Agargel - Zonenelektrophorese 22

d. Immunoelektrophorese 25

III. Diskussion 27

B. Isolierung des Insulin-Insulinantikörper-Komplexes mit Hilfe von Aethacridinlactat und Natriumbromid 30

I. Methoden 31

a. Insulinantikörperlösung 31

b. Fällung mit Aethacridinlactat 32

c. Fällung mit Natriumbromid 33

d. Fließschema zu den Fällungen 34

II. Ergebnisse 35

a. Radioaktivitätsmessung 35

b. Überstand Ü 1 :
Messung der Bindungskapazität
für Rinderinsulin 35

c. Überstand Ü 2 :
Immunoelektrophorese
und Autoradiogramm 36

III. Diskussion 37

C. Zusammenfassung 37

Literaturverzeichnis 39

A. Reinigung von Insulinantikörpern durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat

Die unter der Insulinbehandlung bei Diabetikern oder der Insulinschocktherapie bei Geisteskranken auftretende Insulinresistenz ist häufig immunologischen Prozessen zuzuschreiben, denn das Insulinmolekül kann als Antigen die Bildung von spezifischen Antikörpern auslösen. Diese Insulinantikörper gehören zu den γ-Globulinen. Nachgewiesen wurden sowohl großmolekulare Antikörper vom γ M-Typ, als auch kleinmolekulare vom γ G- und γ A-Typ. (Lit. - Übersicht bei DITSCHUNEIT et al 1966)

Im Verlaufe der Immunisierung findet eine Typenwandlung statt: zunächst werden vorwiegend großmolekulare Antikörper vom γ M-Typ gebildet, später kleinmolekulare vom γ G- und γ A-Typ.

Die verschiedenartigen γ-Globuline lassen sich physikalisch voneinander trennen, hauptsächlich nach dem Molekulargewicht und der elektrischen Ladung.

Aus dem Serum können die γ-Globuline besonders leicht durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung isoliert werden und bei Humanserum ist eine weitere Differenzierung innerhalb des γ-Globulin Bereichs möglich (KALLEE et al 1963).

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, durch eine fein abgestufte Ammoniumsulfatfällung die Insulin bindenden Antikörper weitgehend zu isolieren.

I. METHODEN

Für die nachstehend beschriebenen Versuche kamen sieben verschiedene Seren zur Verwendung, aus denen zehn Ansätze gebildet wurden.

a) Seren:

1. Human - Normal - Serum Dis., B.
2. Human - Normal - Serum Har., W.
3. Diabetikerserum Jet., J. mit einer Bindungskapazität für Rinderinsulin von ca. 2,7 µg/ml
4. Diabetikerserum Sto.,A. mit einer Bindungskapazität für Rinderinsulin von ca. 1,32 µg/ml
5. Diabetikerserum Moz., A. mit einer Bindungskapazität für Rinderinsulin von ca. 1,68 µg/ml
6. Diabetikerserum Wag., P. mit einer Bindungskapazität für Schweineinsulin von ca. 1,74 µg/ml
7. Diabetikerserum Ben., H. mit einer Bindungskapazität für Rinderinsulin von ca. 0,61 µg/ml
   für Schweineinsulin von ca. 0,54 µg/ml

Die Messung der Bindungskapazitäten erfolgte mit dem Standardansatz der Routinebestimmung (Agargel- Zonenelektrophorese, KALLEE 1965) nach folgendem Schema:

für Rinderinsulin:

10 µl ^{131}J-Insulin (Farbwerke Hoechst);
25 µl Trägerinsulin; 250 µl Serum,

für Schweineinsulin:

50 µl eines Gemischs von 0,75 ml ^{131}J-Insulin (Farbwerke Hoechst) + 0,25 ml Trägerinsulin; 250 µl Serum.

b.) Ansätze:

Aus den Seren Nr. 1; 2 und 4 - 6 wurde je ein Ansatz mit einem Volumen von 3 ml hergestellt; aus dem Serum Nr. 3 hingegen drei und aus dem Serum Nr. 7 zwei Ansätze mit ebenfalls je 3 ml Volumen (Tab. 1). Die radiojodierten Insuline dienten als Indikatoren für die Insulin - Antikörper.

Je 3 ml der Seren 1; 2; 4; 5 und 7 sowie 3 x 3 ml des Serums 3 wurden versetzt mit

125 ng ^{131}J-Rinderinsulin ≈ 42 ng/ml

(≙ 690 nCi oder 230 nCi/ml)

und je 3 ml der Seren 6 und 7 mit

3,44 ng ^{131}J-Schweineinsulin ≈ 1,1 ng/ml

(≙ 588 nCi oder 196 nCi/ml)

und bei 37 ^{o}C 2 Stunden lang inkubiert.

Durch die radioaktive Markierung des Insulinmoleküls mit ^{131}J werden seine antigenen Eigenschaften nicht so stark verändert, daß dies bei den üblichen immunologischen Bestimmungen ins Gewicht fiele (Lit.-Übersicht bei KALLEE, 1968). Das intakte ^{131}J-Insulin geht keine unspezifischen schwerreversiblen Bindungen mit normalen Serumproteinen ein, so daß die Immunadsorption zum Nachweis ausreichend spezifisch ist.

Tabelle 1

Ansatz Lfd.Nr.	Serum Nr.	Volumen pro Ansatz	^{131}J-Insulin vom
(1)	1. Human-Normal-Serum Dis., B.	3 ml	Rind
(2)	2. Human-Normal-Serum Har., W.	3 ml	Rind
(3)	3. Diabetikerserum Jet., J.	3 ml	Rind
(4)	3. Diabetikerserum Jet., J.	3 ml	Rind
(5)	3. Diabetikerserum Jet., J.	3 ml	Rind
(6)	4. Diabetikerserum Sto., A.	3 ml	Rind
(7)	5. Diabetikerserum Moz., A.	3 ml	Rind
(8)	7. Diabetikerserum Ben., H.	3 ml	Rind
(9)	7. Diabetikerserum Ben., H.	3 ml	Schwein
(10)	6. Diabetikerserum Wag., P.	3 ml	Schwein

d.) Absteigende fraktionierte Ammoniumsulfatfällung:

Die Seren wurden zunächst vorgereinigt durch 50 % - und 40 % - Ammoniumsulfat - Sättigung.

Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung erfolgte dann von 36,8 % -Ammoniumsulfat-Sättigung ausgehend in Stufen von 0,6 % bis 0,8% , bis zur 27,7 % - Sättigung.

Jeder der mit ^{131}J-Insulin markierten Ansätze von 3 ml Volumen wurde mit derselben Menge gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt (≙ 50 % Sättigung) und anschließend bei 1700 $\bar{g}$ 20 Minuten lang zentrifugiert. Die Ammoniumsulfatlösung war bei ca. 25 ^{o}C gesättigt und hatte eine Dichte von 1,249 ($g \cdot cm^{-3}$).

Die weitere Reihenfolge war:

Tabelle 2

Fällung Nr.	Niederschlag der jeweils vorhergeg. Fällung gelöst in ml H_2O	ml gesätt. AS-Lösung zugefügt	AS-Sättigung =
2.	3	2	40 %
3.	3	1,75	36,8 %
4.	3	1,70	36,2 %
5.	3	1,65	35,5 %
6.	3	1,60	34,8 %
7.	3	1,55	34,1 %
8.	3	1,50	33,3 %
9.	3	1,45	32,6 %
10.	3	1,40	31,8 %
11.	3	1,35	31,0 %
12.	3	1,30	30,2 %
13.	3	1,25	29,4 %
14.	3	1,20	28,6 %
15.	3	1,15	27,7 %

Bei jeder Fraktion wurden die Radioaktivität der Sedimente und deren Volumina gemessen. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte in einem Szintillationsbohrlochkristall (FH 49, Frieseke und Hoepfner, Erlangen).

e.) Von jedem Ansatz wurden die Überstände mit der höchsten Radioaktivitätsausbeute vereinigt, in Visking Dialysierschläuche (Serva, Heidelberg) abgefüllt und drei Tage lang bei 4 °C gegen 1000 ml NaCl 0,09 %, Cialit^{R} (Asid, München) 0,01 % ausdialysiert. Die dialysierten Lösungen wurden lyophilisiert, die Trockensubstanzen gewogen und in so viel H_2O gelöst, daß die NaCl-Endkonzentrationen etwa 0,9 % - 1,2 % betrugen.

Diese konzentrierten γ-Globulin-Lösungen wurden immunoelektrophoretisch geprüft, außerdem wurde durch Agargel-Zonenelektrophorese ihre Bindungskapazität für Rinderinsulin oder Schweineinsulin bestimmt.

II. E R G E B N I S S E

a.) Radioaktivitätsmessung:

In Tabelle 3 sind - für die verschiedenen Ammoniumsulfat-Konzentrationen - die Radioaktivitäten von Sediment und Überstand in Prozentwerten angegeben, bezogen auf die Ausgangsradioaktivität des jeweiligen Ansatzes vor Beginn der Ammoniumsulfatfällung. Diese Ausgangsradioaktivität sei 100 %. Als Standardwert dienten 0,5 ml des Überstandes nach 50 %-Ammoniumsulfatfällung aus Ansatz (1).

Die gesamte Meßreihe wurde ohne Unterbrechung durchgeführt. Ein Einfrieren der Proteinfraktionen war deshalb nicht nötig.

Die Messung der Sedimentvolumina erfolgte auf folgende Art und Weise: Nach jeder Fällung wurde das Sediment, dem Versuchsverlauf entsprechend, in 3 ml H_2O gelöst. Die Differenz zwischen der zugefügten Menge H_2O (= 3 ml) und dem gemessenen Volumen nach Auflösung des Sedimentes wird als Sedimentvolumen bezeichnet.

Tabelle 3

As-Sättigung in %		Radioaktivität in %, bezogen auf Ausgangsradioaktivität und Sedimentvolumina (ml)									
		Ansatz(1) Norm. Ser. Dis., B.	Ansatz(2) Norm.Ser. Har., W.	Ansatz(3) Diab.Ser. Jet., J.	Ansatz(4) Diab.Ser. Jet., J.	Ansatz(5) Diab.Ser. Jet., J.	Ansatz(6) Diab.Ser. Sto., A.	Ansatz(7) Diab.Ser. Moz., A.	Ansatz(8) Diab.Ser. Ben., H.	Ansatz(9) Diab.Ser. Ben., H.	Ansatz(10) Diab.Ser. Wag., P.
50	a)	21	21	4	6	5,5	12,7	6	11	13	6,7
	b)	79	79	96	94	94,5	87,3	94	89	87	93,3
	c)	1,0	1,0	1,4	1,4	1,4	1,2	1,5			1,5
40	a)	26	24	8	4,5	4	4	5	12	25	7,8
	b)	53	55	88	89,5	90,5	83,3	89	77	62	85,5
	c)	0,95	0,95	1,1	1,1	1,1	1,1	1,25			1,1
36,8	a)	19,4	21,4	0,8	2	2	5,3	1,4	3	9	11
	b)	33,6	33,6	87,2	87,5	88,5	78	87,6	74	53	74,5
	c)	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	1,2			0,9
36,2	a)	11,4	10,6	0,9	0,7	0,5	4,4	1,4	8	5,5	8
	b)	22,2	23	86,3	86,8	88	73,6	86,2	66	47,5	66,5
	c)	0,3	0,3	0,8	0,8	0,8	0,6	1,0			0,8
35,5	a)	7,7	6,6	1,2	0,8	0,6	1,4	1,4	14	7,5	3,5
	b)	14,5	16,4	85,1	86	87,4	72,2	84,8	52	40	63
	c)	0,25	0,25	0,65	0,65	0,65	0,55	0,9			0,7
34,8	a)	3,3	4	1,3	2	2,4	5,2	1,8	7	7	3,7
	b)	11,2	12,4	83,8	84	85	67	83	45	33	59,3
	c)	0,2	0,2	0,55	0,55	0,55	0,5	0,8			0,6
34,1	a)	2,8	2,6	2,1	2	2	6,3	2	10	6	3,8
	b)	8,4	9,8	81,7	82	83	60,7	81	35	27	55,5
	c)	0,15	0,15	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7			0,5

a) = Überstand
b) = Sediment
c) = Sedimentvolumen

Fortsetzung Tabelle 3

AS-Sättigung in %		Radioaktivität in %, bezogen auf Ausgangsradioaktivität und Sedimentvolumen (ml)									
		Ansatz(1) Norm.Ser. Dis., B.	Ansatz(2) Norm.Ser. Har., W.	Ansatz(3) Diab.Ser. Jet., J.	Ansatz(4) Diab.Ser. Jet., J.	Ansatz(5) Diab.Ser. Jet., J.	Ansatz(6) Diab.Ser. Sto., A.	Ansatz(7) Diab.Ser. Moz., A.	Ansatz(8) Diab.Ser. Ben., H.	Ansatz(9) Diab.Ser. Ben., H.	Ansatz(10) Diab.Ser. Wag., P.
33,3	a)	2,1	2,1	5,1	2	3	10	2,3	9	6	3, 9
	b)	6,3	7,7	76,6	80	80	50,7	78,7	26	21	51,6
	c)	0,1	0,1	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45			0,45
32,6	a)	1,8	1,8	6,1	3,7	3,5	44,4	2,5	7	5	4,4
	b)	4,5	5,9	70,5	76,3	76,5	6,3	76,2	19	16	47,2
	c)	0,1	0,1	0,4	0,4	0,4	0,05	0,6			0,4
31,8	a)	1,1	1,3	9,0	3,8	3,5	6,3	2,7	6,2	5	1,6
	b)	3,4	4,6	61,5	72,5	73	0	73,5	12,8	11	45,6
	c)	0,05	0,05	0,35	0,35	0,35		0,55			0,4
31	a)	0,9	1	10,3	8,5	7,3		11,5	4,1	3,3	7,6
	b)	2,5	3,6	51,2	64	65,7		62	8,7	7,7	38
	c)	0,05	0,05	0,3	0,3	0,3		0,5			0,3
30,2	a)	0,8	0,8	25,6	10,3	10,7		15,5	3	2,7	8,2
	b)	1,7	2,8	25,6	53,7	55		46,5	5,7	5	29,8
	c)	0,05	0,05	0,2	0,25	0,25		0,45			0,25
29,4	a)	0,5	0,6	23,3	13,7	12,8		27,5	1,6	1,6	8,6
	b)	1,2	2,2	2,3	40	42,2		19	4,1	3,4	21,2
	c)	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2		0,4			0,2
28,6	a)	0,4	0,4	2,3	15,2	15,3		19	1	0,7	18,7
	b)	0,8	1,8	0	24,8	26,9		0	3,1	2,7	2,5
	c)	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1		0,0			0,1
27,7	a)	0,2	0,2		24,8	26,9			0,8	0,5	2,5
	b)	0,6	1,6		0,0	0,0			2,3	2,2	0,0
	c)	0,0	0,0		0,0	0,0					0,0

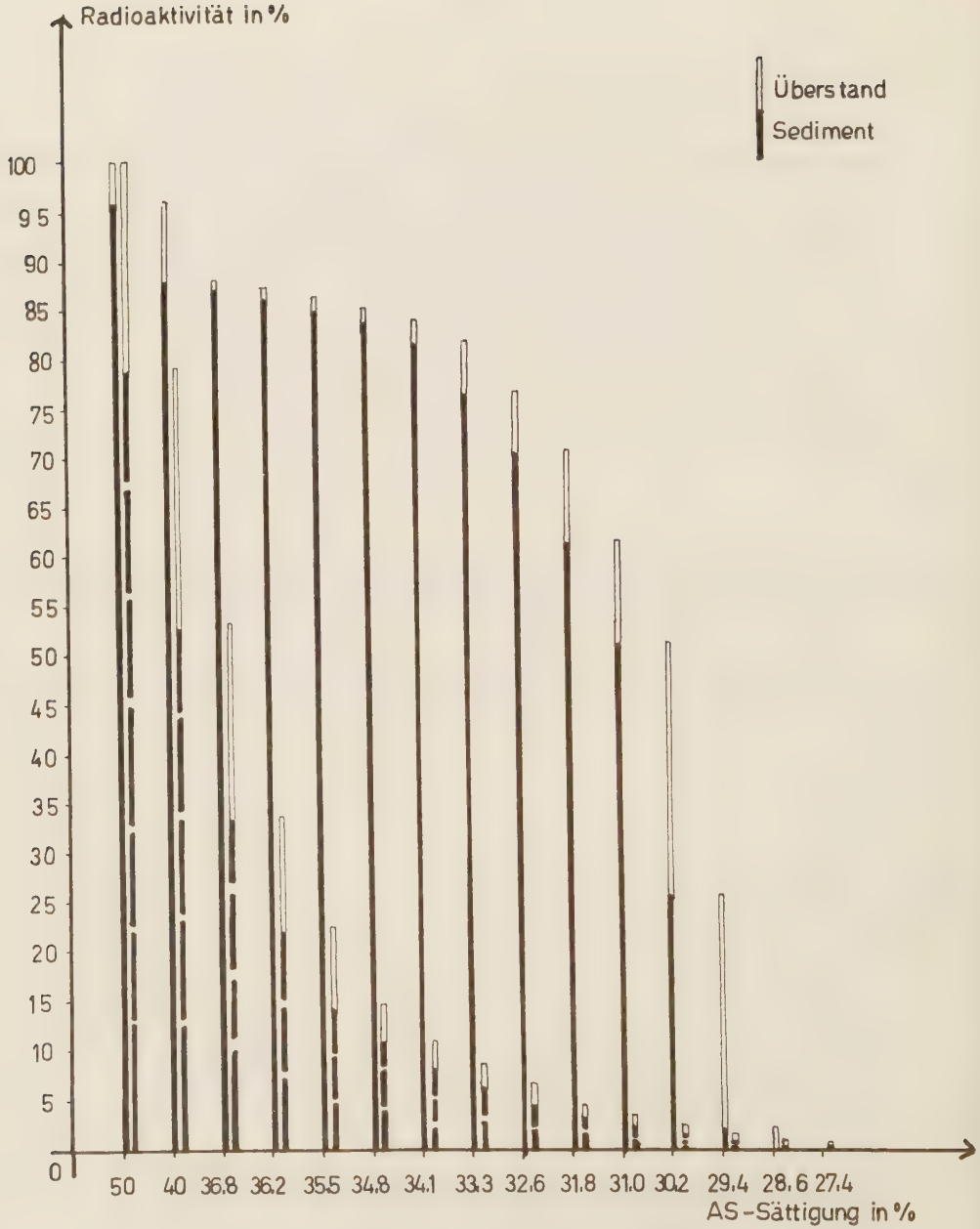
b.) Mit Ausnahme der Ansätze (1) und (2) (Normalseren) sowie (8) und (9) (Diabetikerserum Ben., H.) zeigten die Überstände mit der höchsten Radioaktivitätsausbeute eine starke Trübung. Diese Trübung ließ sich nicht abzentrifugieren, auch nicht nachdem die Überstände 12 Stunden lang bei 4 °C im Kühlraum aufbewahrt worden waren. Die Trübung konzentrierte sich im oberen Teil der Flüssigkeitssäule, während die unteren zwei Drittel vollkommen klar blieben. Auch nach einer Erhöhung der Ammoniumsulfat-Konzentration auf 50 % - Sättigung setzte sich diese Trübung nicht ab, und es konnte kein Sediment abzentrifugiert werden.

Tabelle 4

	Diab.Ser. Jet., J. Ansatz(3)	Diab.Ser. Jet., J. Ansatz(4)	Diab.Ser. Jet., J. Ansatz(5)	Diab.Ser. Sto., A. Ansatz(6)	Diab.Ser. Moz., A. Ansatz(7)	Diab.Ser. Wag., P. Ansatz(10)
Trübung				32,6 %		
im Über-				31,8 %		
stand					30,2 %	30,2 %
nach AS-					29,4 %	29,4 %
Sätti-	28,6 %	28,6 %	28,6 %		28,6 %	28,6 %
gung von		27,7 %	27,7 %			27,7 %

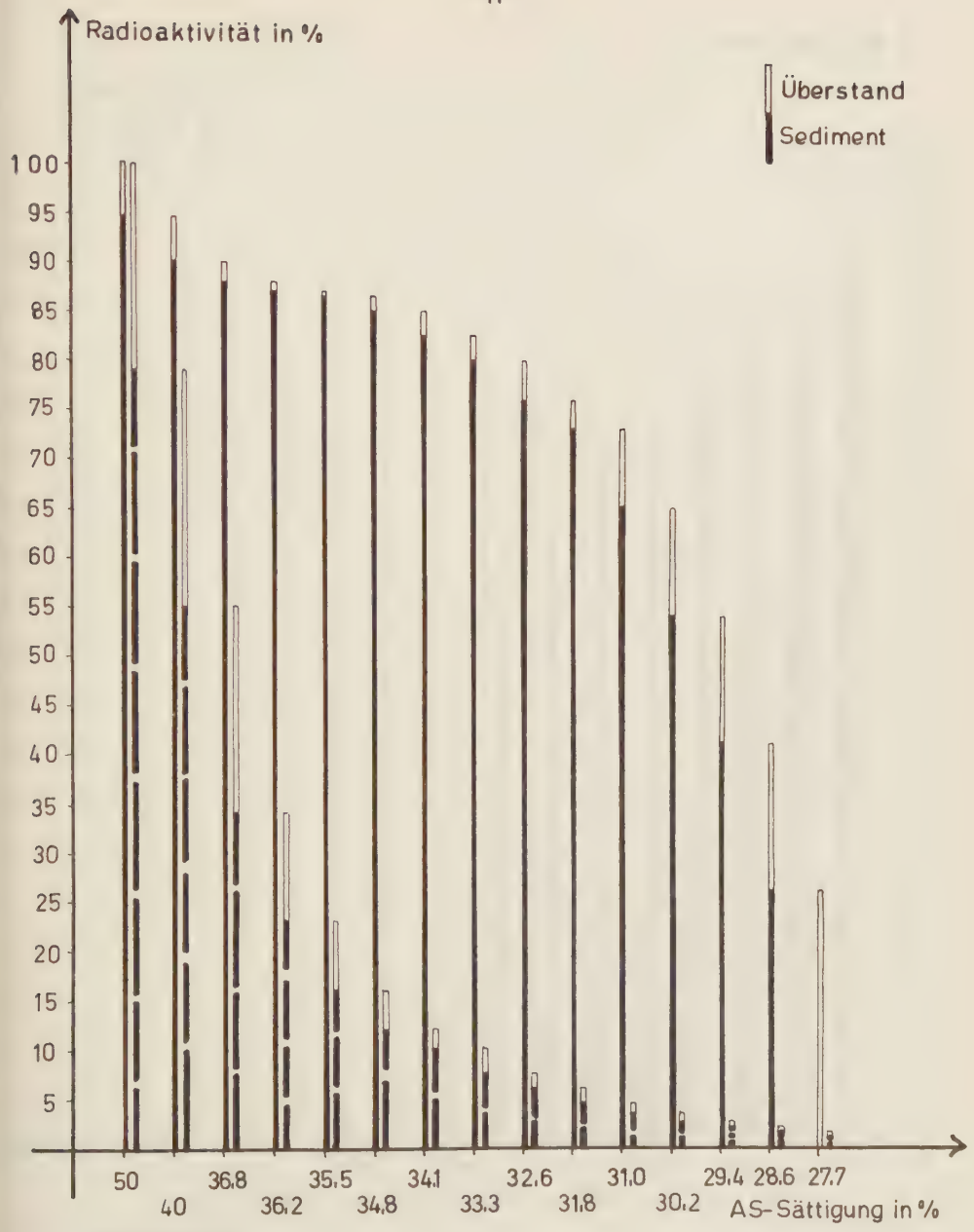
c.) In den folgenden Schaubildern wird das Verhalten der Diabetikerseren bei der AS-Fällung mit dem der Normalseren verglichen.

Auf der x-Achse werden die AS-Konzentrationen aufgetragen, auf der y-Achse die Radioaktivitäten von Sediment und Überstand.



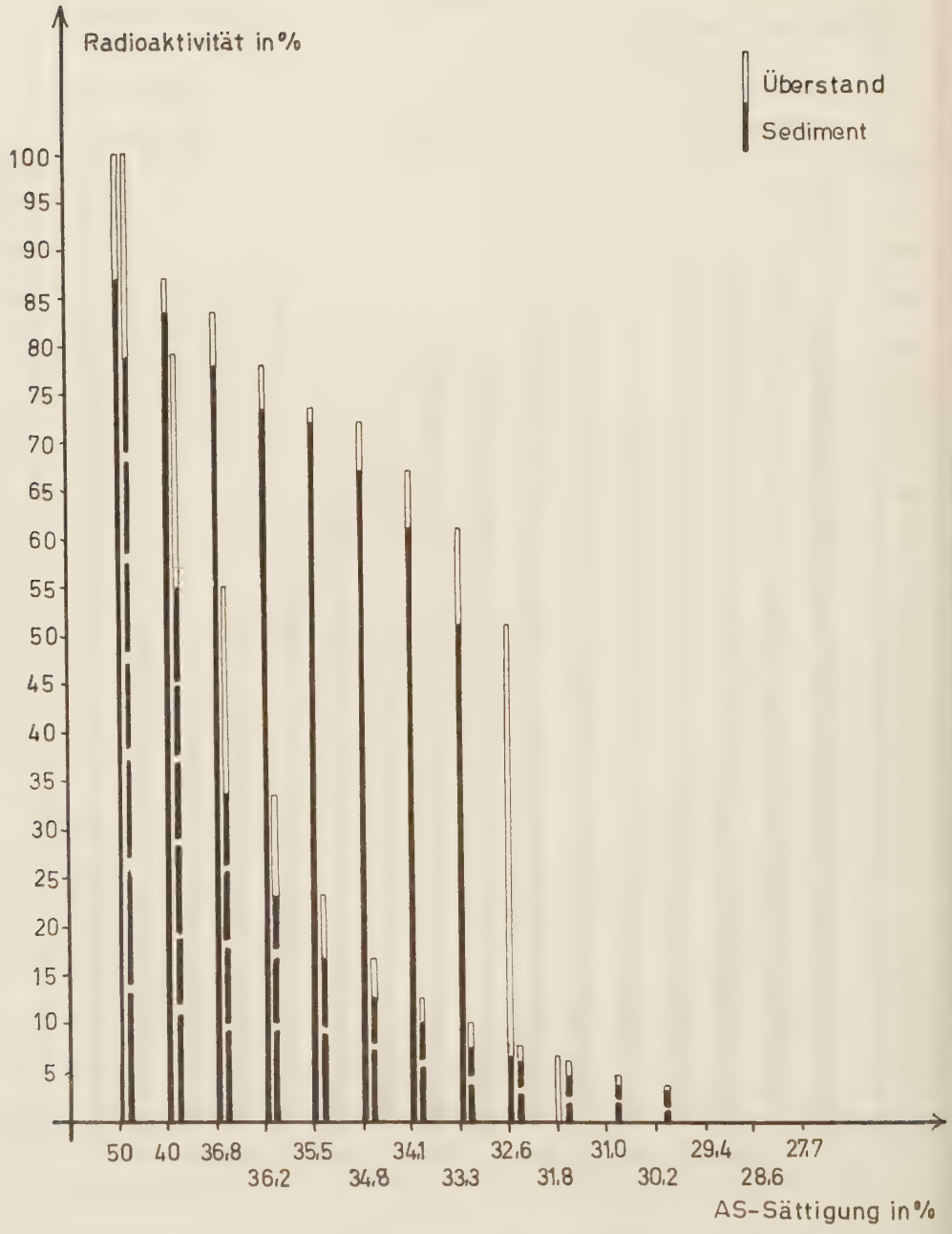
——NORMALSERUM

——DIABETIKERSERUM ANSATZ(3)SER. JETT., J.



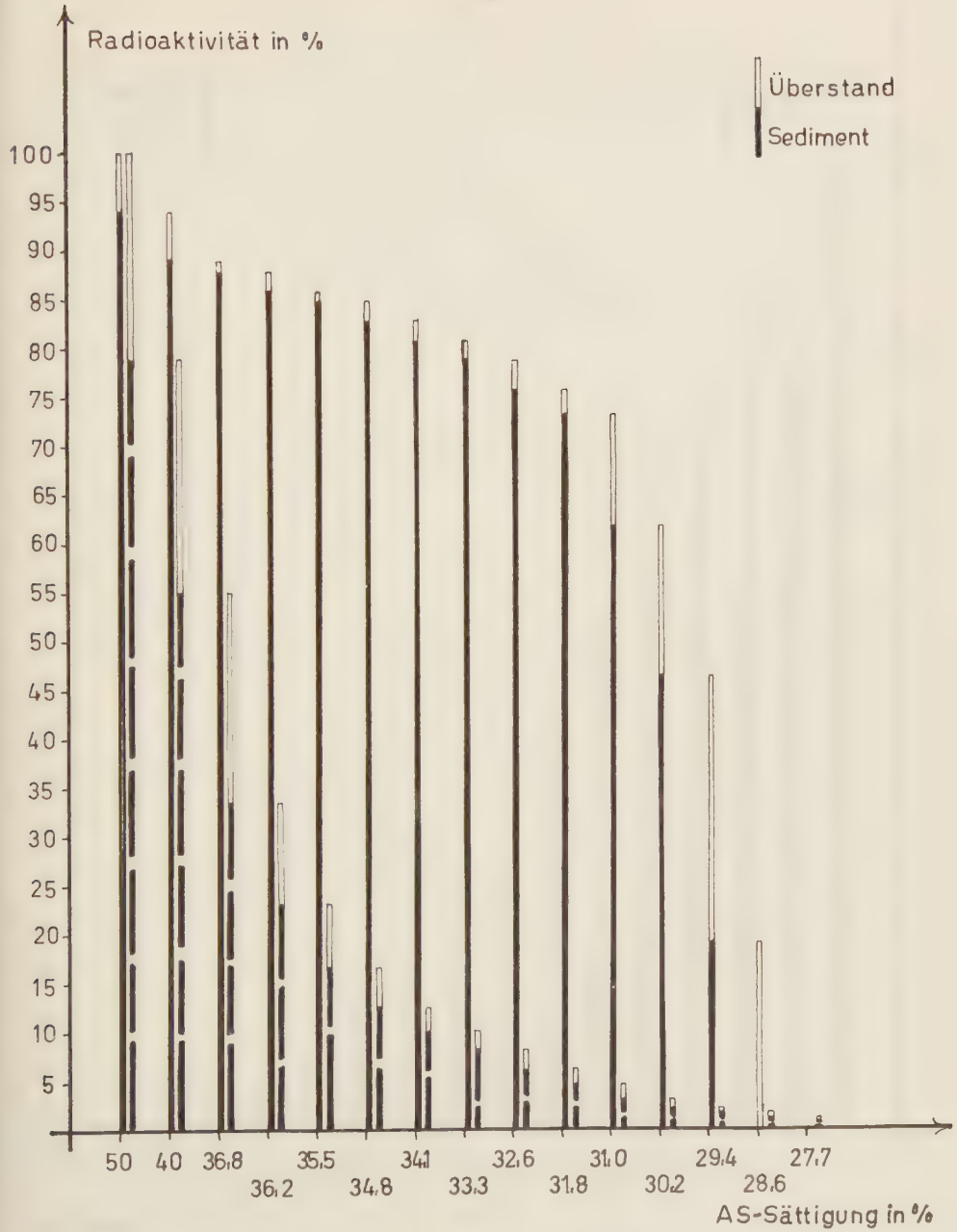
NORMALSERUM

DIABETIKERSERUM ANSATZ (4+5) SER. JETT. J.



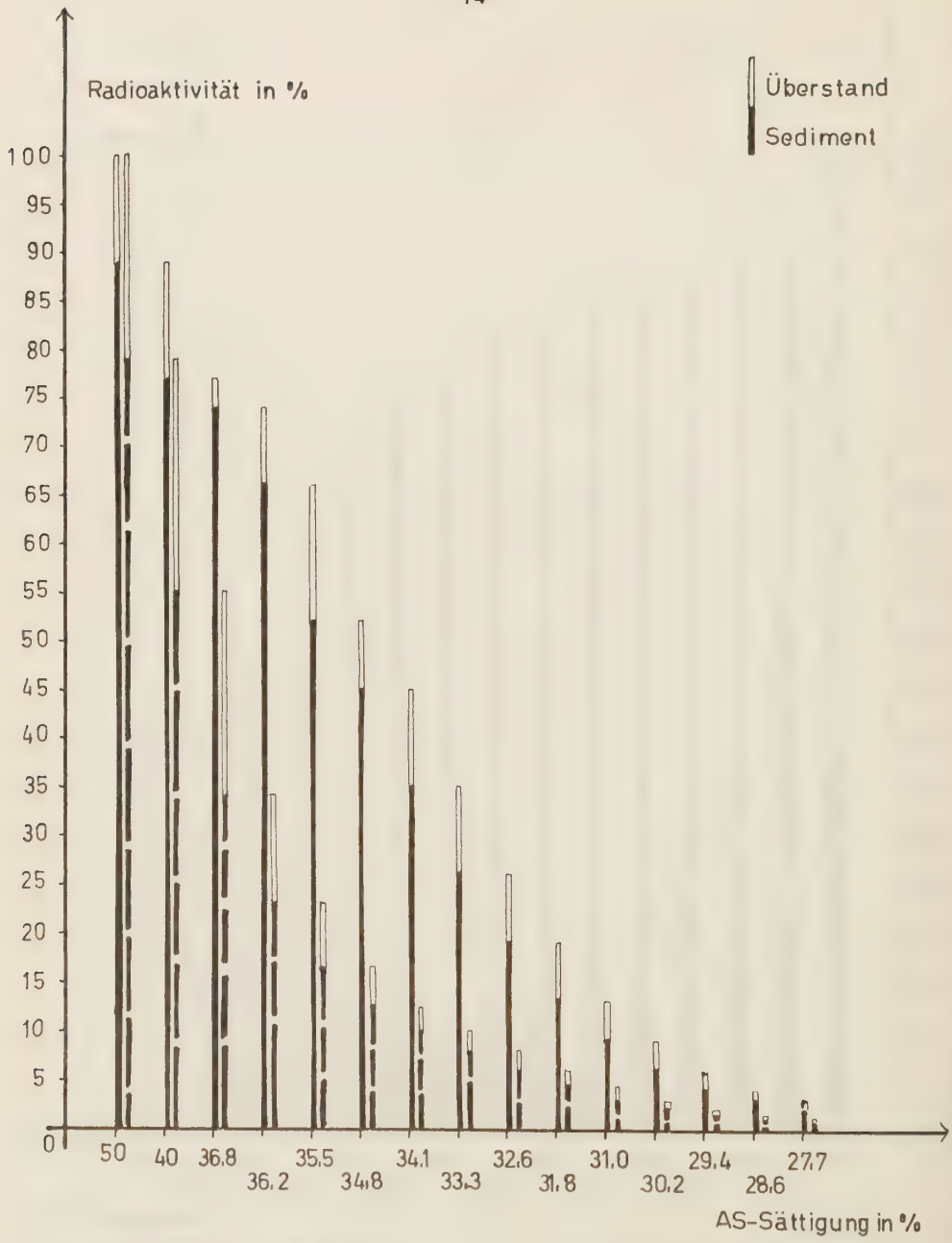
—— NORMALSERUM

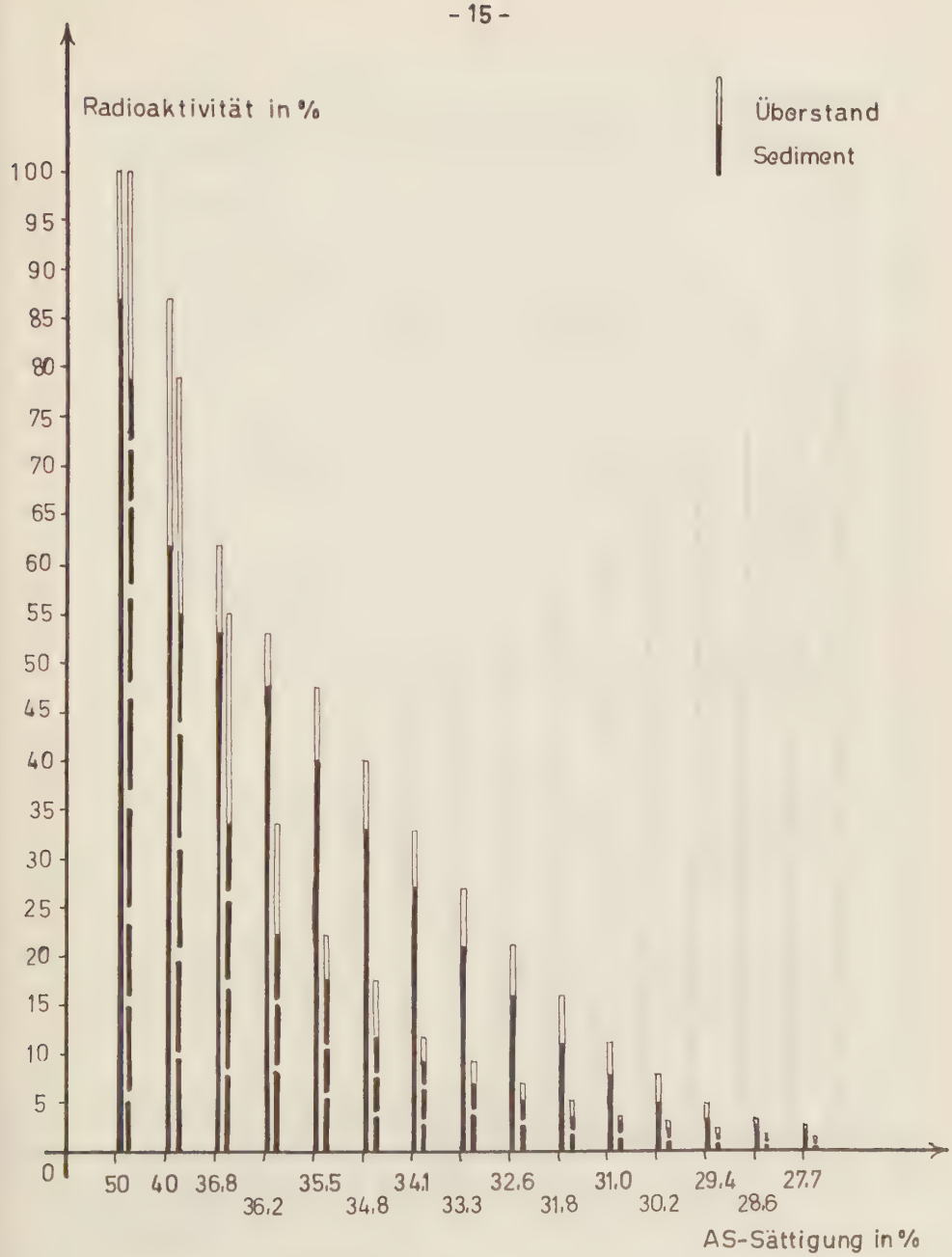
—— DIABETIKERSERUM ANSATZ(6) SER. Stol.A.

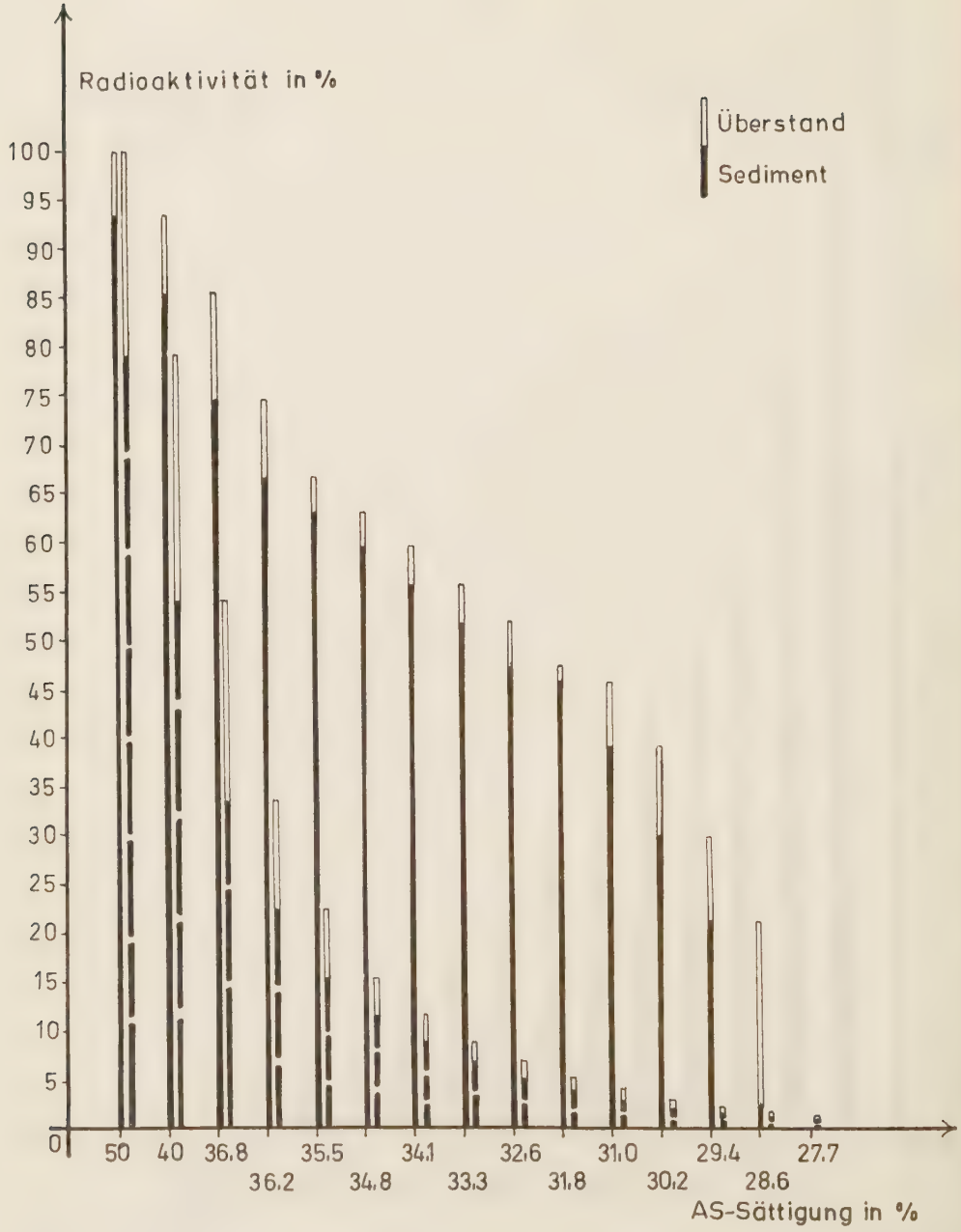


——— NORMALSERUM

——— DIABETIKERSERUM ANSATZ (7) SER. Moze. A.


Radioaktivität in %
Überstand
Sediment
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
50
40
36.8
36.2
35.5
34.8
34.1
33.3
32.6
31.8
31.0
30.2
29.4
28.6
27.7
AS-Sättigung in %
NORMALSERUM
DIABETIKERSERUM
ANSATZ(8) SER. BEN.H


Radioaktivität in %
Überstand
Sediment
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
50
40
36,8
36,2
35,5
34,8
34,1
33,3
32,6
31,8
31,0
30,2
29,4
28,6
27,7
AS-Sättigung in %
——NORMALSERUM
——DIABETIKERSERUM
ANSATZ(9) SER. BEN. H.



NORMALSERUM

DIABETIKERSERUM ANSATZ (10) SER. WAGN.P.

Nach Auswertung der Radioaktivitätsmessung wurden folgende Überstände für die weitere Untersuchung (Agargel-Zonenelektrophorese und Immunoelektrophorese) ausgewählt :

Aus Ansatz (3), Diab. Ser. Jet., J.

Überstände nach AS-Sättigung von 30,2 % und 29,4 % mit einer Radioaktivitätsausbeute von insgesamt 49 %

Aus Ansatz (4), Diab. Ser. Jet., J.

Überstände nach AS-Sättigung von 30,2 %; 29,4 %; 28,6 % und 27,7 % mit einer Radioaktivitätsausbeute von insgesamt 64 %

Aus Ansatz (5), Diab. Ser. Jet., J.

Überstände nach AS-Sättigung von 30,2 %; 29,4 %; 28,6 % und 27,7 % mit einer Radioaktivitätsausbeute von insgesamt 65, 7 %

Aus Ansatz (6), Diab. Ser. Sto., A.

Überstände nach AS-Sättigung von 32,6 % und 31,8 % mit einer Radioaktivitätsausbeute von insgesamt 50,7 %

Aus Ansatz (7), Diab. Ser. Moz., A.

Überstände nach AS-Sättigung von 30,2 %; 29,4 % und 28,6 % mit einer Radioaktivitätsausbeute von insgesamt 62 %

Aus Ansatz (10), Diab. Ser. Wag., P.

Überstände nach AS-Sättigung von 30,2 %; 29,4 %; 28,6 % und 27,7 % mit einer Radioaktivitätsausbeute von insgesamt 38 %

Zum Vergleich:

Aus Ansatz (1), Normal Ser. Dis., B.

Überstände nach AS-Sättigung von 30,2 % und 29,4 % mit einer Radioaktivitätsausbeute von insgesamt 1,3 %

Aus Ansatz (2), Normal Serum Har., W.

Überstände nach AS-Sättigung von 30,2 % und 29,4 % mit einer Radioaktivitätsausbeute von insgesamt 1,4 %

e.) Diese Überstände wurden in Visking Dialysierschläuche (Serva, Heidelberg) abgefüllt und drei Tage lang bei 4 °C gegen 1000 ml NaCl 0,09 %; Cialit^{R} (Asid, München) 0,01 % ausdialysiert, bei dreimaligem Wechsel der Außenflüssigkeit.

Die Volumina nach Dialyse betrugen:

Ansatz (1) = 11 ml
Ansatz (2) = 11 ml
Ansatz (3) = 13 ml
Ansatz (4) = 26 ml
Ansatz (5) = 26 ml
Ansatz (6) = 14,5 ml
Ansatz (7) = 20,5 ml
Ansatz (10) = 27 ml

f.) Die dialysierten Lösungen wurden lyophilisiert und die Trockensubstanzen gewogen. Nach Abzug des durch die Dialyselösung bedingten Salzgewichtes (1 mg / ml Flüssigkeit nach Dialyse) ergaben sich für die reinen Eiweißmengen folgende Werte:

Ansatz (1), Normal Serum Dis., B. = 0,4 mg

Ansatz (2), Normal Serum Har., W. = 0,4 mg

Ansatz (3), Diabetiker Serum Jet., J. = 12,9 mg

Ansatz (4), Diabetiker Serum Jet., J. = 33,5 mg

Ansatz (5), Diabetiker Serum Jet., J. = 33,5 mg

Ansatz (6), Diabetiker Serum Sto., A. = 26 mg

Ansatz (7), Diabetiker Serum Moz., A. = 45,3 mg

Ansatz (10), Diabetiker Serum Wag., P. = 34,3 mg

g.) Die Trockensubstanzen wurden in H_2O gelöst. Die Eiweißkonzentrationen sollten möglichst hoch bleiben, die Kochsalzkonzentrationen zwischen 0,9 % und 1,2 % liegen. Es wurden deshalb zunächst zugefügt:

Zu Trockensubstanz aus:

Ansatz (1)	1,0 ml H_2O
Ansatz (2)	1,0 ml H_2O
Ansatz (3)	1,5 ml H_2O
Ansatz (4)	2,0 ml H_2O
Ansatz (5)	2,0 ml H_2O
Ansatz (6)	1,5 ml H_2O
Ansatz (7)	1,5 ml H_2O
Ansatz (10)	2,0 ml H_2O

Bei allen Ansätzen ging der größte Teil der Trockensubstanz nicht in Lösung. Er setzte sich als feinsandiges Sediment ab. Das Volumen der Lösungsflüssigkeit wurde deshalb erhöht auf 3 ml.

Tabelle 5

	Norm.Ser. Dis., B. Ansatz(1)	Norm.Ser. Har., W. Ansatz(2)	Diab.Ser. Jet., J. Ansatz(3)	Diab.Ser. Jet., J. Ansatz(4)	Diab.Ser. Jet., J. Ansatz(5)	Diab.Ser. Sto., A. Ansatz(6)	Diab.Ser. Moz., A. Ansatz(7)	Diab.Ser. Wag., P. Ansatz(10)
Radioaktivitätsausbeute der weiterverarbeiteten Überstände in %	1,3	1,4	49	64	65,7	50,7	62	38
Volumen nach der Dialyse in ml	11	11	13	26	26	14,5	20,5	27
Gewicht der reinen Eiweißtrockensubstanzen in mg	0,4	0,4	12,9	33,5	33,5	26	45,3	34,3
Trockensubstanzen gelöst in ml H_2O	3	3	3	3	3	3	3	3
Bindungskapazität der Ausgangssubstanzen in µg/ml	-	-	2,7	2,7	2,7	1,32	1,68	1,74

h.) Auch nach dieser Volumenerhöhung auf 3 ml löste sich das Sediment nicht auf. Deshalb wurde es abzentrifugiert und die Radioaktivität von Sediment und Überstand bestimmt.

Dabei ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 6

	Radioaktivität in %		Überstand bezogen auf Ausgangsradio-aktivität in %
	Sediment	Überstand	
Diab. Ser. Jet., J. Ansatz (3)	44	56	27
Diab. Ser. Jet., J. Ansatz(4)	37	63	40
Diab. Ser. Jet., J. Ansatz (5)	37	63	41,5
Diab. Ser. Sto., A. Ansatz (6)	54,5	45,5	23
Diab. Ser. Moz., A. Ansatz (7)	47,5	52,5	33
Diab. Ser. Wag., P. Ansatz(10)	57	43	16

Nach der Dialyse und dem Lyophilisieren konnten also bei den verschiedenen Ansätzen zwischen 16 % und 42 % der Ausgangsradioaktivität wieder in Lösung gebracht werden.

Für die weitere Untersuchung wurden die Ansätze (1) und (2) sowie die Ansätze (4) und (5) (Tab. 1) jeweils vereinigt.

i.) Agargel - Zonenelektrophorese

Geht man davon aus, daß die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf Sediment und Überstand der quantitativen Verteilung der Insulinantikörper entspricht, dann läßt sich das theoretisch erreichbare Ergebnis der Agargel - Zonenelektrophorese vorausberechnen.

Beispiel:

Ansatz (3), Diab. Ser. Jet., J.

Bindungskapazität der Ausgangssubstanz: 2,7 µg/ml

Volumen der Ausgangssubstanz: 3 ml

Jetzt noch vorhandene lösliche Radioaktivität in ebenfalls 3 ml Substanz: 27 % (Tabelle 6)

Damit ist die theoretisch erreichbare Bindungskapazität 27 % von 2,7 µg/ml, also ungefähr 0,73 µg/ml.

Für die anderen Ansätze lassen sich nach Tabelle 5 und Tabelle 6 dieselben Überlegungen anstellen.

Die berechneten Ergebnisse lauten:

Ansatz (4), Ansatz (5), Diab. Ser. Jet., J. = 1,10 µg/ml

Ansatz (6), Diab. Ser. Sto., A. = 0,30 µg/ml

Ansatz (7), Diab. Ser. Moz., A. = 0,55 µg/ml

Ansatz (10), Diab. Ser. Wag., P. = 0,28 µg/ml

k.) Die Messung der Bindungskapazitäten erfolgte wieder, wie bei Versuchsbeginn, mit dem Standardansatz.

Bei der gelelektrophoretischen Bestimmung der Insulinbindungskapazität der gereinigten Antikörper fanden sich folgende Werte:

Ansatz (3) Diab. Ser. Jet., J. = 0,62 µg/ml

Ansatz (4)
Ansatz (5) Diab. Ser. Jet., J. = 1,14 µg/ml

Ansatz (6) Diab. Ser. Sto., A. = 0,37 µg/ml

Ansatz (7) Diab. Ser. Moz., A. = 0,57 µg/ml

Ansatz (10) Diab. Ser. Wag., P. = 0,2 µg/ml

In der folgenden Tabelle werden die errechneten Werte den gemessenen gegenübergestellt.

Tabelle 7

	errechneter Wert in µg/ml	gemessener Wert in µg/ml
Ansatz (3) Diab.Ser.Jet.,J.	0,73	0,62
Ansatz (4) Ansatz (5) Diab.Ser.Jet.,J.	1,10	1,14
Ansatz (6) Diab.Ser.Sto.,A.	0,30	0,37
Ansatz (7) Diab.Ser.Moz.,A.	0,55	0,57
Ansatz (10) Diab.Ser.Wag.,P.	0,28	0,2

1.) Ausbeute an löslichen Insulin - Antikörpern

Die Ausbeute an löslichen Insulin-AK ergibt sich durch einen Vergleich der Bindungskapazitäten der Ansätze vor Versuchsbeginn und nach der AS-Fällung. Das Volumen beträgt jeweils 3 ml.

Tabelle 8

	Bindungskap. in µg/ml bei Versuchsbeginn = 100 %	Bindungskap. in µg/ml nach AS-Fällung noch löslich	Ausbeute an Insulin-AK in %
Ansatz (3)	2,7	0,62	23
Ansatz (4) Ansatz (5)	2,7	1,14	42
Ansatz (6)	1,32	0,37	28
Ansatz (7)	1,68	0,57	34
Ansatz(10)	1,74	0,2	11

Bei Anwendung der fein abgestuften fraktionierten AS-Fällung ist es also möglich, aus dem Überstand von 2 - 4 Fraktionen zwischen 11 % und 42 % der Ausgangsmenge an Insulin-AK in löslicher Form zu gewinnen.

Dabei zeigt es sich, daß die prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rahmen der Meßgenauigkeit der quantitativen Verteilung der Insulin-AK entspricht. Dieses Ergebnis läßt sich ableiten aus Tabelle 7 oder durch einen Vergleich der rechten Spalten in den Tabellen 6 und 8.

m.) Immunoelektrophorese

Die Immunoelektrophorese sollte Aufschluß geben über den Reinheitsgrad der bisher gewonnenen Lösungen.

Es wurde der Proteingehalt von 6 Überständen qualitativ untersucht. Zum Nachweis dienten 8 verschiedene Antiseren.

Überstände:

1. Aus Ansatz (1) und Ansatz (2) = Normal Serum Dis., B. und Har., W.
2. Aus Ansatz (3) = Diabetikerserum Jet., J.
3. Aus Ansatz (4) und Ansatz (5) = Diabetikerserum Jet., J.
4. Aus Ansatz (6) = Diabetikerserum Sto., A.
5. Aus Ansatz (7) = Diabetikerserum Moz., A.
6. Aus Ansatz(10) = Diabetikerserum Wag., P.

Antiseren (Behringwerke, Marburg)

1. Anti-Humanserum vom Kaninchen
2. Anti-γG-Globulin-Serum
3. Anti-γA-Globulin-Serum
4. Anti-γM-Globulin-Serum
5. Anti-α_2-Makroglobulin-Serum
6. Anti-β-Lipoprotein-Serum
7. Anti-α_1-Lipoprotein-Serum
8. Anti-Albumin-Serum

o.) Es konnten folgende Proteine nachgewiesen werden:

Ansatz (1) und (2), Normalserum

γ^A - Globulin

γ^G - Globulin

Ansatz (3), Diabetikerserum Jet., J.

γ^A - Globulin

γ^G - Globulin

Ansatz (4) und (5), Diabetikerserum Jet., J.

γ^A - Globulin

γ^G - Globulin

Ansatz (6), Diabetikerserum Sto., A.

γ^A - Globulin

γ^G - Globulin

Ansatz (7), Diabetikerserum Moz., A.

γ^A - Globulin

γ^G - Globulin

Ansatz (10), Diabetikerserum Wag., P.

γ^A - Globulin

γ^G - Globulin

Die immunoelektrophoretisch untersuchten Überstände enthielten also nur noch die γ-Globulin-Fraktionen, in welche die Insulinantikörper einzureihen sind. Eine Verunreinigung durch andere Proteine konnte nicht nachgewiesen werden. Insbesondere der Nachweis von γ^M-Globulinen, α_2-Makroglobulinen, ß-Lipoproteinen, α_1-Lipoproteinen und Albuminen war nicht möglich.

Herrn Dr. med. H. J. Braun danke ich bestens für die freundliche Hilfe bei der Auswertung der immunoelektrophoretischen Befunde.

III. D I S K U S S I O N

a.) Bei der absteigenden fraktionierten Ammoniumsulfatfällung zeigt sich ein eindeutiger Unterschied im Verhalten von Normalseren und Diabetikerseren, die mit ^{131}J-Insulin als radioaktivem Indikator markiert wurden. Beide Gruppen reagieren charakteristisch.

Trägt man in einem Schaubild auf der x-Achse die AS-Sättigung auf und auf der y-Achse die Radioaktivitätsausbeute, so ergibt sich bei den Normalseren für die Radioaktivitäten von Sediment und Überstand ein hyperbelähnlicher Verlauf.

Demgegenüber geht bei Diabetikerseren das Maximum der Radioaktivität erst gegen Ende des γ-Globulin-Bereichs, das heißt bei niederen AS-Konzentrationen in den Überstand, während die Radioaktivitätsverluste bei den Sedimenten der vorhergehenden Fraktionen unbedeutend sind (Ausnahme: Diabetikerserum Ben., H.).

Charakteristisch ist weiterhin, daß bei den Diabetikerseren die Überstände mit der höchsten Radioaktivitätsausbeute eine starke Trübung zeigten, während die entsprechenden Überstände der Normalseren vollkommen klar blieben.

Durch die Immunoelektrophorese konnten die Proteine, die diese Trübung verursachten, nicht nachgewiesen werden, da sie bei der Dialyse oder beim Lyophilisieren offenbar denaturierten. Trotzdem kann vermutet werden, daß es sich um Lipoproteine handelt, die mit den Insulinantikörpern verbunden sind und mit diesen zusammen bei bestimmten AS-Konzentrationen in den Überstand gehen.

Möglicherweise handelt es sich aber auch um einen Insulin-Phospholipoid-Komplex, wie er von RISDALL (1967) beschrieben wurde.

Wahrscheinlich hängt es weitgehend von den Lipoproteinen oder Phospholipoiden ab, bei welcher AS-Konzentration die Insulinantikörper im Überstand auftreten.

Dies könnte auch das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Diabetikerseren erklären.

Das Maximum der Radioaktivitätsausbeuten im Überstand lag nämlich zwischen 32,6 % AS-Sättigung (Ansatz (6)) und 27,7 % AS-Sättigung (Ansatz (4) und (5)), während in allen Überständen immunoelektrophoretisch nur γA- und γG-Globuline nachweisbar waren.

b.) Folgende Tatsachen sprechen dafür, daß die Insulinantikörper an Lipoproteine gebunden sind:

1. Die starke Trübung der Überstände ließ sich nicht abzentrifugieren. Sie sammelte sich vielmehr locker im oberen Drittel der Ammoniumsulfatlösungen.

2. Beim Diabetikerserum Ben., H. trat diese Trübung nicht auf. Die Radioaktivitätsmessung ergab aber gerade bei diesem Serum nicht die charkteristische Verteilung wie bei den übrigen Diabetikerseren.

3. Nach der Dialyse und dem Lyophilisieren wurde bei den Diabetikerseren ein für reine γ-Globuline in diesem Fällungsbereich verhältnismäßig hohes Gewicht an Trokkensubstanz gemessen (Tabelle 5)!

4. Diese Trockensubstanz löste sich nur teilweise in physiologischer NaCl-Lösung. Der quantitativ weitaus

größte Teil war offensichtlich denaturiert und hielt zwischen 40 % und 50 % der Insulinantikörper unlöslich zurück. Die Frage bleibt offen, ob es sich hierbei um eine chemische Bindung, oder einen rein mechanischen Einschluß der Insulinantikörper handelt.

5. Wichtig erscheint vor allem die unterschiedliche Verteilung der Sedimentvolumina bei Normal- und Diabetikerseren. Beim Normalserum zeigt sich der größte Schwund an Sedimentvolumen bei 36,2 % AS-Sättigung. Hier gehen teilweise Lipoproteine in den Überstand. In derselben AS-Fraktion nimmt bei den Diabetikerseren das Sedimentvolumen aber nur unwesentlich ab (Tabellen 3a und 3b).

c.) Mit der angegebenen Methode ist es möglich, 20 % bis 40 % der Ausgangsmenge an Insulinantikörpern stark konzentriert in löslicher Form zu gewinnen. Als Verunreinigung treten nur γ-Globuline auf, die wie die Insulinantikörper zu den γA- oder γG-Globulinen gehören. Andere Proteine konnten in den Überständen nicht nachgewiesen werden.

Der lösliche Insulinantikörper läßt sich weiter konzentrieren. Die Antikörperlösungen werden dazu dialysiert gegen 0,09 % NaCl, anschließend lyophilisiert und die Trokkensubstanzen gelöst in 1/10 des Volumens nach Dialyse.

Der Antikörper wird hierbei nicht zerstört. So sind Lösungen mit einem hohen Antikörper-Titer herstellbar und die γ-Globuline haben einen großen Reinheitsgrad.

B. Isolierung des Insulin-Insulinantikörper-Komplexes mit Hilfe von Aethacridinlactat und Natriumbromid

Aethacridinlactat (= 2-Aethoxy-6,9-diaminoacridin-lactat) ist ein gelber Farbstoff, der als Haut- und Darmdesinfiziens besonders unter dem Namen Rivanol^{R} weit verbreitet ist. Mit Ausnahme von γ-Globulinen (HOREJSI und SMETANA, 1955) und einigen anderen Glykoproteinen (KALLEE et alii, 1964) vermag dieser Acridinabkömmling bei neutralem pH offenbar alle Plasmaproteine zu fällen. Auch Insulin zählt zu den Proteinen, die mit Aethacridinlactat ausfallen (DOERZBACH, 1950).

BECK konnte 1966 mit Hilfe von radioaktiv markiertem Insulin zeigen, daß durch Rivanol^{R} der größte Teil des Insulins (bis zu ca. 80 %) auch aus antikörperhaltigem Diabetikerserum präzipitiert wird. Nach der Fällung entfernte sie aus dem Sediment das Rivanol^{R} durch Auswaschen mit NaCl. Dabei zeigte es sich, daß ein Teil des Insulins wieder in Lösung ging. Ungeklärt war jedoch die Frage geblieben, ob bei der Fällung des Insulins mit Rivanol^{R} der gesamte Insulin - Insulinantikörper - Komplex präzipitiert wird, oder ob eine Aufspaltung in freies Insulin und freien Antikörper stattfindet. Sollte nämlich der gesamte Insulin - Insulinantikörper - Komplex ausfallen, so wäre dies eine Möglichkeit, die Insulinantikörper von den übrigen Gammaglobulinen zu isolieren.

Sinnvoll erschien dieses Vorgehen vor allem, nachdem es gelungen war, mit der fein abgestuften, absteigenden, fraktionierten AS-Fällung auf einfache Art und Weise Lösungen herzustellen, die neben dem Insulinantikörper als Verunreinigung nur noch normale γA- und γG-Globuline aufwiesen. Andere Proteine, die von Rivanol^{R} ebenfalls hätten ge-

fällt werden können, waren in diesen Lösungen nicht mehr enthalten. Durch diese Vorreinigung ließ sich auch die Schwierigkeit umgehen, daß andere Aethacridin - Protein - Sedimente mechanisch eingeschlossen würden.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob mit Hilfe von Aethacridinlactat und NaBr (SCHULTZE und HEREMANS, 1966) die Insulinantikörper von den übrigen Gammaglobulinen isoliert werden können.

I. METHODEN

a.) Insulinantikörperlösung:

Entsprechend den Angaben für die absteigende fraktionierte AS-Fällung im ersten Teil dieser Arbeit wurde aus dem Diabetikerserum Jet., J. eine Lösung hergestellt, in der immunoelektrophoretisch nur noch γA- und γG-Globuline nachweisbar waren. Der pH-Wert betrug 7,0.

(Die Bindungskapazität dieser γ-Globulinlösung für Rinderinsulin betrug 1,2 μg/ml, gemessen mit dem Standardansatz, der Agargelelektrophorese (10 μl ^{131}J-Insulin; 25 μl 0,01 % Trägerinsulin; 250 μl Serum).)

6 ml der γ-Globulinlösung Jet., J. wurden mit 64 ng ^{131}J-Insulin radioaktiv markiert ($\triangleq$ 600 nCi). Zur Ausschöpfung der Bindungskapazität dienten noch 7,5 μg Trägerinsulin. Es wurden 4 Ansätze mit jeweils 1,5 ml Volumen hergestellt.

b.) Fällung mit Aethacridinlactat:

(siehe Fließschema S.34)

Zur Fällung des Insulins wurden jedem Ansatz von 1,5 ml γ-Globulinlösung hinzugefügt:

0,25 ml Rivanol^R 4 % und
0,05 ml 1-m-Ammoniumcarbaminat.

Das entspricht einer Rivanolendkonzentration von 0,56 %. Die Zugabe von Ammoniumcarbaminat ergibt eine bessere Sedimentierung des Aethacridinlactats, da dieses dann kein klebriges Konglomerat bildet. Dies macht sich bei der nachfolgenden NaBr-Fällung bemerkbar. Das Rivanol-Insulin-Sediment muß dann nämlich nicht mehr mechanisch verrieben werden, sondern es löst sich ohne Schwierigkeiten in H_2O.

Nach dem Zentrifugieren (10 min bei 1700 $\bar{g}$) wurden die Rivanol - Ammoniumcarbaminat - Überstände dekantiert und vereinigt. Die Radioaktivität der Rivanol-Sedimente wurde gemessen. Die gesammelten Überstände der 4 Ansätze wurden als Ü 1a bezeichnet, die Sedimente als S 1. Ü 1a hatte ein Volumen von ungefähr 7 ml. Zur Entfernung des überschüssigen Rivanols wurde zu Ü 1a 1 ml 30 %-NaBr hinzugefügt, der Ansatz abzentrifugiert und das Sediment verworfen. Der Überstand Ü 1 wurde in einen Visking Dialysierschlauch abgefüllt und drei Tage lang bei 4 °C gegen 1 Liter NaCl 0,09 %, Cialit^R 0,01 % ausdialysiert, bei dreimaligem Wechsel der Außenflüssigkeit. Die dialysierten Lösungen wurden lyophilisiert, die Trockensubstanzen gewogen und in soviel H_2O gelöst, daß die NaCl-Endkonzentration etwa 0,9 % betrug. Von der Fraktion Ü 1 wurde dann mit dem Standardansatz die Bindungskapazität für Rinderinsulin bestimmt.

c.) Fällung mit NaBr:

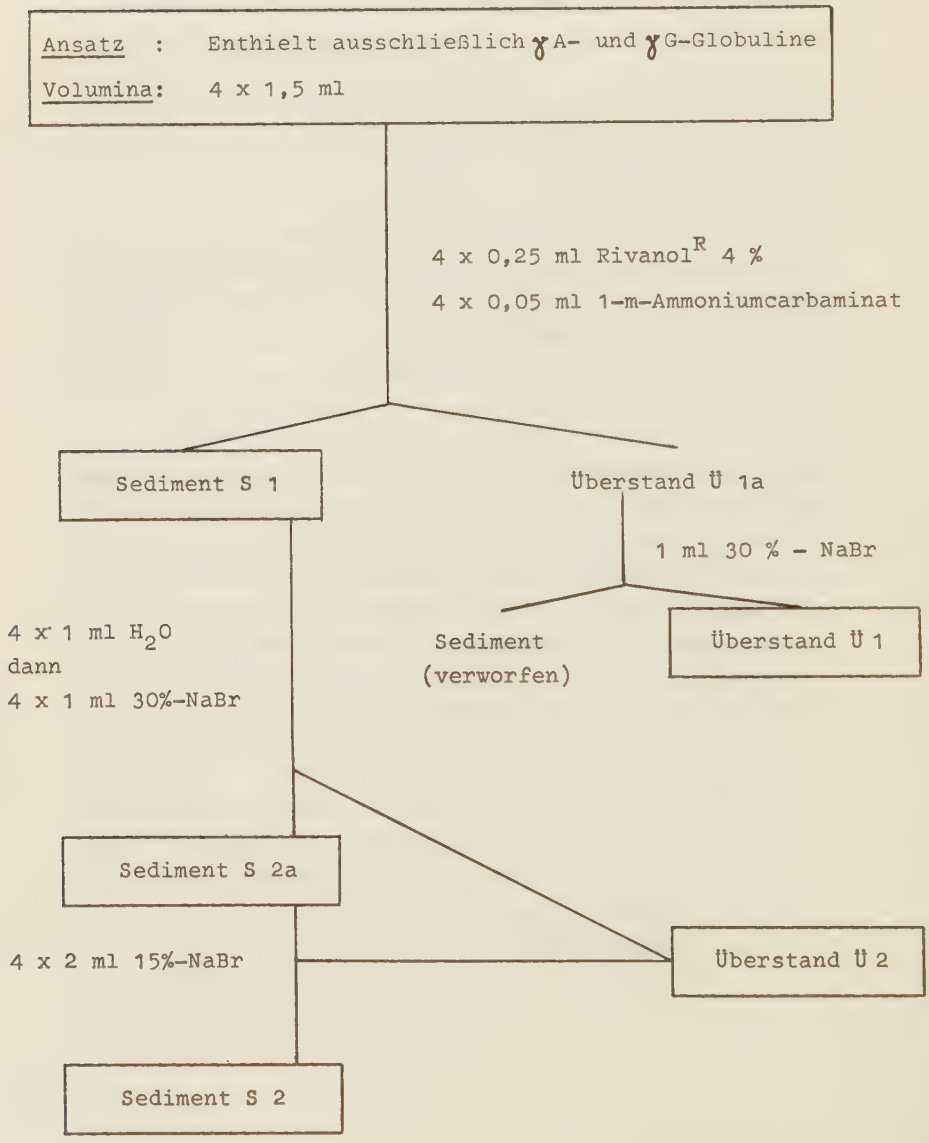
Wie eingehende Vorversuche ergaben, liefert die Fällung des Aethacridinlactats mit NaBr eine wesentlich höhere Ausbeute an löslichem Insulin als das Auswaschen mit NaCl.

Die vier Sedimente nach der Fällung mit Aethacridinlactat wurden in jeweils 1 ml H_2O gelöst und dann mit 1 ml 30%-NaBr versetzt.

Es fiel bei Zimmertemperatur ein feinflockiger gelber Niederschlag aus, der abzentrifugiert wurde (10 min bei 1700 $\bar{g}$). Die farblosen Überstände wurden dekantiert und die Sedimente S 2a mit jeweils 2 ml 15%-NaBr ausgewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Sedimente vereinigt (=S2) und ebenso die Überstände (=Ü2).

Die Gesamtradioaktivität von S 2 wurde gemessen. Ü 2 wurde, wie bei Ü 1 angegeben, dialysiert, lyophilisiert, die Trockensubstanz gewogen und aufgelöst in H_2O, daß die Kochsalzkonzentration wiederum 0,9 % betrug. Ü 2 wurde immunoelektrophoretisch untersucht. Außerdem sollte ein Autoradiogramm Aufschluß darüber geben, ob Ü 2 insulinbindende Gammaglobuline enthielt.

Schema der Fällungen mit Aethacridinlactat und NaBr



II. E R G E B N I S S E

a.) Radioaktivitätsmessung

Die Ausgangsradioaktivität aller 4 Ansätze mit jeweils 1,5 ml Volumen sei 100 %. Nach der Rivanolfällung konnte im Sediment S1 die gesamte Ausgangsradioaktivität nachgewiesen werden. Aus diesem Sediment S1 wurden bei der folgenden NaBr-Fällung wieder 82 % der Ausgangsradioaktivität in Lösung gebracht.

Radioaktivität in % bezogen auf Ausgangsradioaktivität:

Sediment S 1	100 %
Sediment S 2	18 %
Überstand Ü 2	82 %

b.) Überstand Ü 1 : Messung der Bindungskapazität für Rinderinsulin:

Das Gewicht der Trockensubstanz betrug - abzüglich des durch die Dialyse bedingten Salzgewichtes - 7,7 mg. Das Volumen nach Dialyse war 12 ml. Die Trockensubstanz wurde gelöst in 1,2 ml H_2O. Dies entsprach einer NaCl Konzentration von ca. 0,9 %. Im Überstand Ü 1 konnten mittels Agargelzonenelektrophorese keine insulinbindenden Gammaglobuline nachgewiesen werden.

c.) Überstand Ü 2 : Immunoelektrophorese
und Autoradiogramm

Gewicht der Trockensubstanz nach Abzug des durch die Dialyse bedingten Salzgewichtes: 18,7 mg

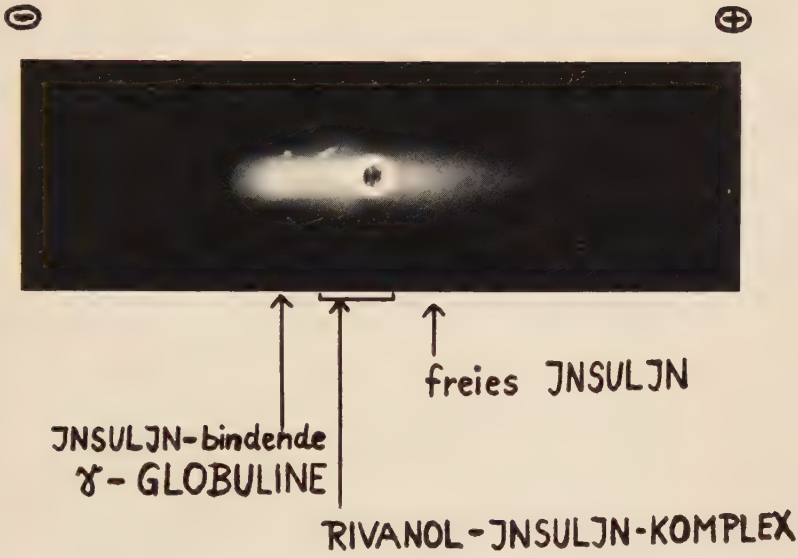
Volumen nach Dialyse: 28,0 ml

Trockensubstanz gelöst in 2,8 ml H_2O

Kochsalzendkonzentration: ca. 0,9 %.

Immunoelektrophoretisch konnten im Überstand Ü 2 γG-Globuline, sowie geringe Spuren von γA-Globulinen nachgewiesen werden.

Das Autoradiogramm erbrachte eindeutig den Nachweis, daß im Überstand Ü 2 neben freiem Insulin auch Insulinantikörper enthalten waren. Eine geringfügige, aber deutlich sichtbare Menge ^{131}J-Insulin war wahrscheinlich an Rivanolspuren gebunden. Dieser Rivanol - Insulin - Komplex fiel teils an der Auftragstelle aus, teils wanderte er als löslicher Komplex zur Kathode.


⊖
⊕
freies INSULIN
INSULIN-bindende
γ-GLOBULINE
RIVANOL-INSULIN-KOMPLEX

III. D I S K U S S I O N

Mit der beschriebenen Aethacridinlactat - Natriumbromid - Fällung scheint es möglich zu sein, die insulinbindenden Gammaglobuline von den normalen Gammaglobulinen zu trennen. Während normale Gammaglobuline in Aethacridinlactat löslich waren, wurde der gesamte Insulin-Insulinantikörper-Komplex von Rivanol^{R} präzipitiert.

Das Autoradiogramm zeigte, daß im Überstand Ü 2 nach NaBr-Fällung freies Insulin und an Antikörper gebundenes Insulin enthalten waren. Auf diesem Wege ist also offenbar eine Reindarstellung der insulinbindenden Gammaglobuline prinzipiell möglich.

C. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Fünf Diabetikerseren, die insulinbindende Antikörper enthielten und zwei normale Humanseren wurden mit ^{131}J-Insulin versetzt und einer dreizehn-stufigen absteigenden Feinfraktionierung mit Ammoniumsulfat im Sättigungsbereich zwischen 36,8 % und 27,7 % unterworfen. Während das radioaktive Insulin aus den Normalseren bis zur 32 % - Sättigung in ziemlich gleichmäßigen Schritten zu 95 % löslich war, blieb bei vier Diabetikerseren die Radioaktivität in Form des Insulin - Insulinantikörper - Komplexes auch noch unterhalb der 31 %- bis 32 % - Sättigung präzipitierbar. Im Bereich der 28%- bis 30 % - Sättigung ließ sich ein großer Teil des Insulinantikörpers zusammen mit reinem γA- und γG-Globulin gewinnen.

Möglicherweise findet eine Bindung von Insulin an Phospholipoide oder Lipoproteine statt, die vorzugsweise in diesem Ammoniumsulfat - Sättigungsbereich ausfallen.

2. Im Gegensatz zu normalen Gammaglobulinen fiel der vorgereinigte lösliche Insulinantikörper mit Aethacridinlactat in Gegenwart von Ammoniumcarbaminat aus. Der Antikörper-Farbstoffkomplex ließ sich mit 15 % - NaBr - Lösung dissoziieren.

Mit der angegebenen kombinierten Fällungsmethode wird es wahrscheinlich möglich sein, Insulinantikörper erheblich anzureichern und zu reinigen.

L I T E R A T U R

BECK, H.
Über insulinbindende Gammaglobuline
Inaug. - Diss. Univ. Tübingen, 1966

BERSON, S. A., and R. S. YALOW
Insulinantagonists, Insulinantibodies and Insulinresistance
Amer. J. Med. 30, 155, (1958)

CERACI, E., O. HOGENMAN, R. LUFT, I. PORATH and A. ROOVETE
Insulin Antibodies: Description of Specific Serum Protein Localisation in a Patient with Insulin Resistant Diabetes
Diabetologia, 2, 45, (1966)

DITSCHUNEIT, H., und K. FEDERLIN
Die Pathophysiologie der Insulinresistenz
Dtsch. med. Wschr. 91, 853, (1966)

DOERZBACH, E.
Über Chemie und Biologie des Surfen-Insulins
Dissert. 1950, Joh.-Gutenberg-Univ. Mainz

HIRATA, Y., and H. T. BLUMENTHAL
Demonstration of a Precipitating Insulinbinding Antibody in the Sera of Insulintreated Guinea Pigs and Rabbits
J. Lab. and Clin. Med. 62, 683, (1963)

HOREJSI, J.,and R. SMETANA
The effect of rivanol on plasma proteins. The isolation of gamma globulin from blood - plasma by rivanol
Congr. intern. biochim., Resumés communs, 3. Congr. Brussels, 1955, 14

KALLEE, E., G. LANG und W. HEINZEL
Neuer quantitativer, immunologischer Nachweis der leichtreversiblen Adsorption an Proteine
Acta Isotop. 3: 303, (1963)

KALLEE, E., S. DEBIASI, C. KARYPIDIS, K. HEIDE und H. - G. SCHWICKI
^{60}CO - Vitamin B_{12} - bindende Glykoproteine
Acta Isotop. 4: 103, (1964)

KALLEE, E.
Ergebn. Labor. - Med. 3: 109 - 144, 1967 (11. Jahreskongreß für Laboratoriumsmedizin, Bad Kissingen 5. - 9. Mai 1965), Medicus, Berlin, 1967

KALLEE, E.
Radiojodiertes Insulin
In: Diabetes Mellitus, Pathophysiologie und Klinik, Hrsg. E. PFEIFFER, I. F. LEHMANN Verlag, München, 1968 S. 247 - 254

LOVELESS, M. H., and J. R. CANN
Immunologic Studies of Insulin in Man Effect of Heat on Allergenicity Diabetes 7, 278, (1958)

LOWELL, F. C.
Immunological studies in insulin resistance. II. The presence of a neutralizing factor in the blood exhibiting some character of an antibody
J. Clin. Invest. 23, 233, (1944)

MILLER, H., and G. OWEN
Immuno - Electrophoresis of Insulinbinding Antibodies
Nature 188, 67, (1960)

MITCHELL, M. L.
Abnormal Insulin - Binding Fraction Demonstrated by the Electrophoresis on Ion - Exchange Paper of Sera from Diabetic Patients J. Clin. Endocrinol. a. Metabol. 20, 1319,(1960)

MORSE, I. H., and I. F. HEREMANS
Immunoelectrophoretic Analysis of Humans Insulinbinding Antibody and its Papain - Produced Fragments
J. Lab. Clin. Med. 59, 891,(1962)

RISDALL, P. C.
The preparation and some biological properties of insulin - lipid complexes Sixth international diabetes congress Stockholm, 1967

SCHULTZE, H. E., and I. F. HEREMANS
Molecular biology of human proteins with special reference to plasma proteins. Vol. 1. Nature and metabolism of extracellular proteins, 1966
Amsterdam (usw.): Elsevier, 1966

YAGI, Y., P. MAIER and D. PRESSMANN
Two Different Anti - Insulin Antibodies in Guinea Pig Antisera J. Immunol. 90, 760,(1963)

Herrn Professor Dr. E. Kallee möchte ich für das Thema
und die freundliche Anleitung zu dieser Arbeit danken.

Lebenslauf

Am 2. Oktober 1941 wurde ich, Bernd Disser, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Hans Disser und seiner Ehefrau Käthe, geb. Gärtner, in Stuttgart geboren. Ich besuchte die Volksschule und das Gymnasium in Stuttgart.

Nach Ableistung meines Wehrdienstes begann ich im Sommersemester 1964 an der Universität Tübingen mit dem Studium der Zahnheilkunde und bestand im Oktober 1966 die zahnärztliche Vorprüfung.

Am 30.6.1969 schloß ich das Studium mit dem Staatsexamen ab.